

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. J. Borneff)

**Fluoreszenzserologische Untersuchungen über die Ursache der
toxischen Wirkung von Antibiotika auf Meerschweinchen**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von Christine Welker, Medizinalassistentin, Mainz 1963

Dekan: Prof. Dr. Bredt

Referent: Priv.-Doz. Dr. Carlson

Korreferent: Prof. Dr. Borneff



Lebenslauf

Am 14. Juni 1938 wurde ich, Christine Welker, als erste Tochter des Studienrates Fritz Welker und seiner Ehefrau Käthe, geb. Glaser, in Pirmasens geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich dort die Volksschule und von 1948 bis 1957 das altsprachl. Gymnasium, das ich am 1. März 1957 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Seit Sommersemester 1957 studierte ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz Medizin. Nach fünf vorklinischen Semestern bestand ich hier im Oktober 1959 die ärztliche Vorprüfung. Mein weiteres, klinisches Studium verbrachte ich ebenfalls an der Mainzer Universität. Nach 11 Semestern meldete ich mich zum Staatsexamen, das ich in der Zeit vom 6. 8. 1962 bis 28. 1. 1963 ablegte. Ab 1. März 1963 bin ich im Stadtkrankenhaus Pirmasens als Medizinalassistentin tätig.

Mainz, im Februar 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554405_0055

Orale Antibiotikatherapie führt teilweise zu Änderungen in der Zusammensetzung der Darmflora und in deren Folge zu Störungen des gesamten Organismus. Beim Menschen kann ein schweres Krankheitsbild ausgelöst werden. Am ausgeprägtesten sind diese Erscheinungen bei Meerschweinchen. Besonders schlecht vertragen sie Penicillin, Aureomycin, Terramycin und Erythromycin, besser dagegen Streptomycin und Chloramphenicol (VELU).

Charitonova berichtet über eine mittlere Lebensdauer nach täglich oralen Gaben bei Chlortetracyclin von 3,9 Tagen, Oxytetracyclin 4,1 und Penicillin 4,5 Tagen. Makroskopisch waren dystrophische Herzmuskelveränderungen, Hyperämie der Meningen, Lungen, Leber und der Darmschleimhaut zu erkennen. Ferner wurden Anzeichen einer Leberdystrophie, Hyperämie der Lymphfollikel, Hyperplasie der Reticulumzellen und histologische Veränderungen der Darmschleimhaut mit Desquamation festgestellt.

Die Rolle des Antibiotikums in diesem Gesamtgeschehen ist nicht eindeutig geklärt. Als Ursache sehen *de Somer*, *Eyssen*, *Effenberger* und *Seeliger*^{1, 2} sowie *Ruschmann* die Vernichtung grampositiver und eine Vermehrung gramnegativer Keime an. Es kommt zu einer Intoxikation mit Enteritis. Kulturell fanden sich ante finem im Darminhalt 70 % gramnegative coliforme Bakterien, daneben *Bact. proteus*, Enterokokken und Hefen (*de Somer*). Nach *Kalich* können sich normale *E. coli* im Dünndarm toxisch verhalten. *de Somer* nimmt an, daß bei den Tieren infolge der plötzlichen Änderung ihrer Darmbakterienzusammensetzung Permeabilitätsstörungen der Darmkapillaren eintreten, wobei es durch den Flüssigkeits- und Salzverlust zu Elektrolytverschiebungen und zum Tod an Acidose und Hypokaliämie kommt. Dieses schwere Krankheitsbild bleibt aus, wenn man die Tiere durch Gewöhnung an Antibiotika gegen letale Gaben schützt. Höhere Dosen verkürzen die Lebenszeit nicht (*de Somer*).

Rolle und Mayer beobachteten nach Penicillin bei Meerschweinchen ein Überwiegen von *Streptococcus faecalis*; andere Autoren berichten über

neurotoxische (*Tonutti*), gefäßtoxische (*Miescher*) und zytotoxische (*Gernez-Rieux*) Wirkungen sowie allergische Reaktionen (*Ambrus, Kaipainen*). *Eyber* ist der Ansicht, daß für den Tod der Meerschweinchen nach Antibiotika Stoffwechselprodukte ins Ileum aufgewanderter Colibakterien verantwortlich sind, weil bei Verfütterung von sterilen *E. coli*-Kulturfiltraten ohne Antibiotika die gleichen Symptome auftreten. Der Tod (nach Antibiotika) ließ sich verhindern, wenn die Tiere längere Zeit mit kleineren Mengen an *E. coli*-Stoffwechselprodukten vorbehandelt wurden, wobei die Frage pharmakologischer Gewöhnung oder Immunisierung offen blieb (*Eyber*). Ebenso wirkungsvoll sind schwer resorbierbare Sulfonamide, die *E. coli* eliminieren (*Gillissen*).

Sämtliche Versuche lieferten also bis heute nicht den Nachweis, daß tatsächlich *E. coli* für den Tod von Meerschweinchen nach Antibiotika verantwortlich sind. Beweisend wäre nur die Darstellung ihres Endotoxins im Gewebe, denn nicht der Keim, sondern sein im genuinen Zustand an der Zelloberfläche verankertes Lipopolysaccharid (Endotoxin) kann nach Freisetzung eine letale Wirkung entfalten. Eine gleichzeitige Ektotoxinwirkung, wie sie früher vermutet wurde (*Vincent*) ist nicht bestätigt worden (*Hohorst, Lodenkämper, Ulbricht, Fleischhauer*).

E. coli — Lipopolysaccharide

Zur Isolierung und Reindarstellung des Endotoxins gramnegativer Bakterien (vor allem *E. coli*), das mit den Lipopolysacchariden identisch ist (*Böhme*), sind zahlreiche Verfahren erarbeitet worden (*Tomscik, Boivin* ^{1, 2, 3}, *Lodenkämper, Roberts, Raistrick* ^{1, 2}, *Miles, Morgan* ^{1, 2}, *Walker*). Am gebräuchlichsten ist die von *Palmer* und *Gerlough* angegebene Phenol-Wasser-Extraktion, die *Westphal, Lüderitz* und *Bister* vereinfachten. Von den charakteristischsten chemischen Gruppen der bakteriellen Lipopolysaccharide gehen bestimmte biologische Wirkungen aus. So ist wahrscheinlich die Lipoidkomponente (bei gramnegativen Bakterien vermutlich Lipoid A) für die Pyrogenität und Toxizität verantwortlich, während die Polysaccharidkomponente die Wasserlöslichkeit bewirkt (*Westphal* ^{2, 5}).

Das reine Pyrogen besteht aus molekularem, wasserlöslichem Lipopolysaccharid, das zu etwa 75 % aus einer phosphorylierten (6–7 % organisch gebundenes Phosphat) Polysaccharidkomponente und zu 12–13 % (Minimalwert) aus einer lipoidalen Komponente aufgebaut ist (*Westphal* ⁴).

Die pyrogene Wirkung selbst ist im einzelnen noch ungeklärt; sie ist um so geringer, je länger das Endotoxin mit Serum incubiert wird (*Hegemann* ^{1–6}). Man vermutet neben der Bildung von endogenem Pyrogen noch einen direkten Angriffspunkt am Hypothalamus (*Bennett*). Die pyrogene Grenzdosis beim Menschen liegt bei 0,001 µg Lipopolysaccharid/kg (*Westphal* ⁴).

Neben dem fiebererzeugenden Effekt lösen die Lipopolysaccharide noch

andere Reizwirkungen aus, wie Veränderungen im weißen Blutbild (*Delaunay*¹, *Bennett*, *Berthrong*), Anregung hormoneller und enzymatischer Systeme, Störungen im Stoffwechsel, besonders im Kohlehydrat-haushalt (*Menten*, *Delafield*, *Kun*, *Takeday*, *Thomas*), Reizung des Mesenchyms (*Fassbender*) und Aktivierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems (*Altschule*, *Keiderling*^{1, 2}). Am Gefäßapparat kommt es zu Pulsbeschleunigung und infolge rhythmischer Arteriolen spasmen zu verminderter peripherer und mesenterialer Zirkulation (*Delaunay*²⁻⁵). Auf diesem Mechanismus soll auch die tumornekrotisierende Wirkung des Endotoxins beruhen (*Algire*^{1, 2}). Ferner tritt durch Lipopolysaccharide eine Phagocytoseförderung der Leukocyten und eine positive Leukotaxis (*Eichenberger*¹, *Bergmann*, *Fritze*) auf. Die oberflächliche Fixierung der Bakterienreizstoffe an Erythrocyten (*Westphal*¹, *Middlebrook*) führt nach Antiserumzugabe sowohl in vivo (*Boyden*) als auch in vitro (*Neter*²⁻⁵, *Hayes*) zur Agglutination und nach Hinzufügen von Komplement zur Haemolyse (*Böhme*). Die Blutgerinnung wird verlängert (*Eichenberger*¹), wobei es sich um eine heparinähnliche, allerdings 300mal schwächere Wirkung der Lipopolysaccharide handelt (*Freeman*, *Most*, *Heilbrunn*); nach intravenöser Injektion wurde gesteigerte Fibrinolyse beobachtet (*Eichenberger*^{2, 3}). Zu erwähnen ist auch eine Einwirkung auf den Nucleoproteinstoffwechsel der Nervenzellen (*Bammer*²) und deren Regenerationsförderung durch kleine Dosen (*Menten*, *Bammer*¹). Als Folge der Verminderung der Magensaftsekretion und Magenmotilität entsteht eine Ulcushemmung (*Bandes*, *Nechelles*, *Neter*¹). Eine wichtige Rolle spielen die Endotoxine dadurch, daß sie die Abwehrmechanismen gegen heterologe Bakterien zu steigern vermögen (*Böhme*, *Howard*). Für die hierzu notwendige Antigenität der Lipopolysaccharid-Protein-Symplexe ist die Proteinkomponente, für die serologische Spezifität der Polysaccharidanteil verantwortlich (*Westphal*², *Braun*, *Böhme*, *Hunri*, *Kröger*).

Pathologisch-anatomisch fanden *Eichenberger*¹ und Mitarbeiter bei Kaninchen nach letalen Dosen von Lipopolysacchariden Stauungsorgane, großes und schlaffes rechtes Herz, petechiale Blutungen im linken Herzohr, in Thymus, Lungen, mediastinalen und abdominalen Lymphknoten und Nebennieren. Als Todesursache mußte also akutes Versagen des rechten Herzens angenommen werden.

Histologisch wurden am Herzen Auflockerungen der Muskelfasern und besonders im linken Herzohr ausgedehnte Blutungen, ferner Erweiterungen der Lungenkapillaren und kleine Blutungen im Lungenparenchym und in der Pleura beobachtet. Außerdem zeigten sich Verengerungen der Arterien mit subendotheliale und adventitielle Ödem. In der Milz fanden sich kleine Follikelnekrosen. Die Kapillarschlingen der Nierenglomerula waren prall mit Blut gefüllt, das Nierenparenchym wies kleine Blutungen auf. Die Nebenniere zeigte in der Zona fasciculata Lipoidenlagerung und Einzelnekrosen, Erweiterung der Kapillaren der Zona reticularis und der Marksinus. Die Darmwand wies, ähnlich wie im ganzen Verdauungstrakt, Epithelnekrosen und ödematöse Auflockerung der Submucosa, Muscularis propria und Subserosa auf. Im Gehirn war das Gewebe nur gering aufgelockert und der Virchow-Robin'sche Raum etwas erweitert.

Verschiedene Autoren (*Landy*^{1, 2}, *Rosen*) entdeckten beim Menschen und einigen Tierarten einen endotoxin-entgifteten Faktor, der wahrscheinlich an die α -Globulinfraktion gebunden (*Rowley*) und in wechselnden Mengen (*Skarnes*) im Serum vorhanden ist.

Die antigene Eigenschaft des Lipopolysaccharids läßt es mit seinem spezifischen Antikörper reagieren. Solche Immunaggregate sind in histologischen Schnitten nicht sichtbar. Ihre Darstellung ist jedoch fluoreszenz-serologisch möglich. Wir versuchten mit dieser Methode der Frage nachzugehen, ob sich im Dünndarm und in Organen Antibiotika-gefütterter Meerschweinchen *E. coli*-Lipopolysaccharide nachweisen lassen.

Eigene Versuche

Die Markierung von Antikörpern geht auf *Coons*¹⁻⁷ zurück. Das Prinzip besteht darin, ein oder zwei Moleküle Fluorescein an ein Proteinmolekül zu binden (*Coons*⁷). Immunaggregate lassen sich dadurch fluoreszenzoptisch sichtbar machen (*Coons*⁷, *Petuely*, *Poetschke*, *Gädeke*, *Kunz*, *Klein*², *Müller*). Außer Fluorescein eignen sich noch β -Anthrylisocyanat (*Creech*), Rhodaminisocyanat (*Silverstein*), halogenierte Triazine (*Hess*), Sulforhodamin B, das Sulfochlorid der 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonsäure (*Uehleke*) und Tetramethylrhodamin (*Hiramoto*, *Clayton*, *Weber*, *Laurence*, *Mayersbach*, *Redetzki*, *Petuely*², *Wolochnow*, *Petuely*³). Die Gewinnung der zur Markierung benötigten Antikörper erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen gegen Coliendotoxin sowie *E. coli*.

Herstellung der Antikörper gegen Endotoxin

Das nach dem Phenol-Wasser-Verfahren von *Westphal*³ gewonnene Endotoxin (Lipopolysaccharid des — aus dem Stuhl eines Patienten stammenden — *E. coli*-Stammes A = LPS A) wurde einem Kaninchen von 2000 g in phys. NaCl-Lösung zweimal wöchentlich subcutan injiziert (in den ersten Wochen je 1 mg, in der nächsten je 2 mg und in der vierten je 3 mg). Agglutination und Praecipitation des Serums ergaben folgende Werte:

Tabelle 1

Antigen	Titer am 22. Tag	Titer am 30. Tag (Serum konserviert)
Mischvaccine lebende Keime	1 : 3200	1 : 1600
Mischvaccine gekochte Keime	1 : 1600	1 : 800
1 mg LPS A/ml	1 : 128	1 : 256

Herstellung der Antikörper gegen *E. coli*

Als Mischvaccine wurden (wie auch oben bei der Agglutination) zwei serologisch nicht differenzierte *E. coli*-Stämme verwendet (Stamm A aus dem Stuhl eines Patienten, Stamm B aus dem Kot eines Meerschweinchen). 24 Stunden alte Nährgarkulturen beider Stämme wurden mit phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt, nach Auszählen in der Bakterienzählkammer (Zeiss-Thoma, 0,02 mm Tiefe) auf eine Keimzahl von 500 Mill./ml eingestellt, zu gleichen Teilen gemischt und zwei Stunden gekocht. Von dieser Bakterien-suspension erhielt ein Kaninchen zweimal wöchentlich subcutan 0,2 ml in der ersten, 0,4 ml in der zweiten, 0,6 ml in der dritten und 1,0 ml in der vierten Woche. Die Agglutination ergab folgende Werte:

Tabelle 2

Antigen	Titer am 23. Tag	Titer am 30. Tag (Serum konserviert)
Mischvaccine lebende Keime	1 : 3200	1 : 1600
Mischvaccine gekochte Keime	1 : 1600	1 : 800

Aus Tabelle 1 und 2 ist zu ersehen, daß die Immunisierung der Kaninchen mit LPS A sowie *E. coli*-Mischvaccine gleiche Agglutinationstiter ergab. Ein weiterer Immunisierungsversuch mit Mischvaccine mit *Freundschem* Adjuvans verbesserte das Ergebnis nicht.

Reinigung und fluoreszenzoptische Markierung der Antikörper

Die Immunsera gegen *E. coli*, LPS A und ein Normal-Kaninchenserum wurden mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, durch Dialyse gereinigt und auf einen Proteingehalt von 50 mg/ml eingestellt. Um Abnahme bzw. Verlust des Antikörpers zu erfassen, wurde erneut agglutiniert.

Tabelle 3

Antigen	Titer des gereinigten (ungereinigten) Serums mit Antikörper gegen:		
	Mischvaccine	LPS A	ohne Antikörper
Mischvaccine lebende Keime	1 : 320 (1 : 1600)	1 : 320 (1 : 1600)	negativ
Mischvaccine gekochte Keime	1 : 80 (1 : 800)	1 : 80 (1 : 800)	negativ

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, daß die Agglutinationstiter der Immunsera nach Ammonsulfatfällung, Dialyse und Verdünnung auf 50 mg/ml Proteingehalt mit phys. NaCl-Lösung (für die Fluoreszenzmarkierung) um das 5–10fache abgenommen haben.

Die nachfolgende Bindung des Fluorescein-Isothiocyanats an das Protein nach der Methode von *Coons* und die Behandlung mit gereinigtem Leber-

pulver — um spätere unspezifische Anlagerungseffekte im Gewebe herabzusetzen — führte zu einer weiteren Abnahme des Antikörpers gegenüber *E. coli* sowie Lipopolysaccharid A auf etwa 1 : 10.

Versuche mit diesen Immunsere und einem markierten Normalserum zur Kontrolle ließen erkennen, daß auch letzteres sich an *E. coli* anlagerte. Eine Abgrenzung dieses, trotz vorausgegangener Reinigung eintretenden, geringen unspezifischen Effektes von der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion ist nur durch Verdünnung der Seren möglich; dies konnte aber wegen des niedrigen Antikörpertiters nicht erfolgen.

Der Antikörperabfall beruht neben dem Verlust durch Reinigung mit Leberpulver wahrscheinlich auch auf Blockierung der Antikörperrezeptoren, so daß sich für Fluorescein-Markierung nur Seren mit hohem Antikörpergehalt und bestimmten Rezeptoreigenschaften eignen. Die Verwendung von 1-Dimethyl-aminonaphthalin-5-sulfonsäure soll etwas günstiger sein (Petuely³).

Sandwich-Verfahren

Da die direkte Fluoreszenzdarstellung von *E. coli*- bzw. Lipopolysaccharid-Immunaggregaten oder -praecipitaten nicht möglich war, wurde in den weiteren Versuchen das „Sandwich“-Verfahren angewendet. Hierbei wurde ein fluoresceinmarkiertes Antikaninchen-Gamma-Globulin (AKG) an den gereinigten Antikörper vom Kaninchen nach seiner spezifischen Reaktion mit *E. coli* bzw. Lipopolysaccharid A angelagert.

1. Vorversuche:

Arbeitsgang: Das Antigen wurde zunächst mit gereinigtem Kaninchen-Immunserum überschichtet und 60 min. bei 37° C belassen, abgespült mit alkalischer NaCl-Lösung pH 7,2 und in dieser Flüssigkeit 15 min. gewässert. Es folgte die Bindung von fluorescein-markiertem Antikaninchen-Gamma-Globulin 1:5 verdünnt 60 min. bei 37° C; nach erneutem Abspülen und 15 min. Wässern wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Tabelle 4

Bindung von fluorescein-markiertem Antikaninchen-Gamma-Globulin an *E. coli* bzw. Lipopolysaccharid-Immunpraecipitate:

Antigen	Antikörper (gereinigtes Kaninchenserum)	Fluoreszenzbefund
<i>E. coli</i> (Stamm A)	Immunserum 1 : 5	++++
<i>E. coli</i> (Stamm A)	Normalserum 1 : 5	±
LPS A	Immunserum 1 : 5	++++
LPS A	Normalserum 1 : 5	±

Zur Darstellung des *E. coli*-Endotoxins in histologischen Schnitten wurden 0,2 ml von 1mg⁰/oigen LPS-Lösungen Meerschweinchen in Leber oder

Niere injiziert. Weitere Tiere erhielten 1 mg LPS in den mittleren Dünndarmabschnitt bzw. 1–4 mg LPS intraperitoneal.

Von den betreffenden Organen bzw. Dünndarmabschnitten sind nach Tötung der Tiere (30 min. bis 4 Std.) histologische Schnitte und vom Sediment des auszentrifugierten Peritonealexsudates Objektträgerausstriche hergestellt worden. Als Kontrolle dienten Organschnitte von Tieren, die anstelle der LPS die gleichen Mengen phys. NaCl-Lösung appliziert bekommen hatten.

Methodik:

Von den unfixierten Organen werden nach Einbetten in 15%ige Gelatine ca. 15 μ dicke Schnitte mit einem Paraffinmikrotom hergestellt. Das Mikrotom ist mit einem Gefriertisch und Kühleinrichtung für das Messer versehen. Die Objektträger sind vor ihrer Verwendung mit 1%iger Gelatinelösung überzogen, die man in 10%iger Formalinlösung härtet und lufttrocknen läßt (Klein ¹). Die fluoreszenzoptische Darstellung der LPS in den Gewebeschnitten und Peritonealexsudatausstrichen erfolgt dann nach der bereits angegebenen Methodik.

Ergebnisse der Vorversuche

In den Organ- und Dünndarmabschnitten waren kleinere und größere hellgrün fluoreszierende Immunpräzipitate im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Sie konnten im Sediment des Peritonealexsudates gleichfalls nachgewiesen werden. Dort zeigten die Zellen eine fluoreszierende Randzone, während das Zentrum sich auf Grund der größeren optischen Dichte nur schwach abzeichnete.

Das gleiche Zellbindungsvermögen der Lipopolysaccharide wurde an Erythrozyten und Leukozyten festgestellt, die in vitro 30 min. bei 37° C mit Lipopolysacchariden incubiert und dann nach dem angegebenen Verfahren fluoreszenzmikroskopisch dargestellt wurden.

In sämtlichen Kontrollpräparaten blieb die Bildung fluoreszierender Aggregate aus. Ebenso waren Schnitte und Sedimentpräparate des Versuches fluoreszenzoptisch negativ, wenn sie mit normalem Kaninchenserum und markiertem Antikaninchen-Gamma-Globulin behandelt worden waren.

Diese Vorversuche bestätigen, daß freies und angelagertes (sessiles?) Lipopolysaccharid sich fluoreszenzoptisch durch Bildung von Immunpräzipitaten mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper darstellen läßt.

2. Hauptversuche

Unter Antibiotikatherapie kommt es — wie eingangs erwähnt — bei Meerschweinchen zu einer Vermehrung von *E. coli* im Dickdarm und nach Elimini-

nierung der grampositiven Keime zum Aufwandern der *E. coli* in untere Dünndarmabschnitte. Entsprechend der Arbeitshypothese erhebt sich die Frage, ob dadurch vermehrt Coli-Endotoxin in den Organismus übertritt und den Tod der Tiere auslöst.

Um den ersten Teil der Frage experimentell zu klären, erhielten Meerschweinchen peroral Terramycin bzw. Bacitracin.

Terramycin wirkt auf grampositive Keime und gleichzeitig — wenn auch schwächer — auf *E. coli*. Da es vom Organismus resorbiert wird, können bei diesem Versuch gegebenenfalls sekundäre Reaktionen von Seiten des Organismus eintreten. Die antibiotische Aktivität des Bacitracins erstreckt sich dagegen ausschließlich auf grampositive Keime und wird nach peroraler Aufnahme nur bis zu maximal 4 % aus dem Darm resorbiert, so daß eine Beeinflussung des Organismus kaum zu erwarten ist.

Methodik:

10 Meerschweinchen mit einem Gewicht von je 300 ± 20 g erhielten 8 Tage peroral morgens und abends je 5 mg Terramycin in 2 ml Aqua fontana und 10 weitere Tiere Bacitracin in gleicher Dosierung. 5 Kontrolltiere bekamen dieselbe Menge H_2O ohne Antibiotikum. Um den Anteil evtl. serologisch nicht erfaßbarer, originärer Meerschweinchen-Coli einzuengen, wurde am 2. Versuchstag sämtlichen Tieren 0,2 ml einer 24-stündigen 1:10 verdünnten *E. coli*-Bouillon (Stamm A) rectal instilliert.

Zur Verhinderung postmortalen Auswanderns der Darmkeime oder ihrer Stoffwechselprodukte wurde den kranken Versuchstieren ante finem in Äthernarkose Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, ein Teil des Ileums und des Caecums sowie das Gehirn entnommen. Den Tieren, bei denen die Krankheitserscheinungen wieder abklangen und den Kontrolltieren sind am 9. Versuchstag in gleicher Weise Organe und Darmteile entfernt worden.

Zur immunologischen Fluoreszenzdarstellung der LPS wurden histologische Schnitte der Organe mit Immun- bzw. Kontrollseren und fluoreszenzmarkiertem Antikaninchen-Gamma-Globulin behandelt.

Ergebnis der Hauptversuche

3 Tage nach Antibiotikaverfütterung traten bei sämtlichen Tieren die ersten Krankheitssymptome (Meteorismus, Gewichtsverlust und Apathie) auf. Bei 7 Terramycin- und 8 Bacitracin-gefütterten Tieren verschlechterte sich in der Folgezeit dieser Befund. Nach Eröffnung der Bauchhöhle war makroskopisch eine ausgeprägte Gasblähung des gesamten Magen-Darmtraktes feststellbar. Das Gewebe war ödematös, gerötet und in der Bauchhöhle fand sich ein klares Transsudat. Mikroskopische Kontrolluntersuchungen ließen maximale Gefäßerweiterung des Dünndarmes, Caecums und der inneren Organe besonders der Lunge, Leber und der Niere erkennen. Die gesunden Versuchs- und Kontrolltiere zeigten dagegen weder makroskopische noch histologische Veränderungen.

Tabelle 5

Bindung von Komplement an Lipopolysaccharid-Immunaggregate:

Arbeitsgang: Das antigenhaltige Material wurde bei einer Einwirkungszeit von je 30 min. bei 37° C nacheinander überschichtet mit Antikörper, Komplement und fluoreszenzmarkiertem Antikomplement; zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurde jeweils 15 min. in alkalischer NaCl-Lösung pH 7,2 gewässert.

Antigen	Antikörper		Antikomplement	Fluoreszenz- befund
E. coli-LPS in Darm- schnitten?	Immunserum 1 : 5 verd. (inaktiv.)	C' human 1 : 8 verd.	Antihuman- Globulin 1 : 5 verdünnt	+++
E. coli-LPS in Darm- schnitten?	Immunserum 1 : 5 verd. (inaktiv.)	C' human 1 : 4 verd. + EDTA 0,02 m āā	Antihuman- Globulin 1 : 5 verdünnt	∅
E. coli-LPS in Darm- schnitten?	Immunserum 1 : 5 verd. (inaktiv.)	C' human 1 : 8 verd. inaktiv.	Antihuman- Globulin 1 : 5 verdünnt	±

Aus dem Ileum der erkrankten Versuchstiere ließen sich in allen Fällen E. coli züchten, bei den übrigen fehlten sie. Mit Ausnahme der Coli eines Terramycin- und zweier Bacitracin-gefütterten Meerschweinchen agglutinierten sie mit den selbsthergestellten Immunseren. Die Voraussetzung für den Nachweis der Lipopolysaccharide im Gewebe war damit erfüllt.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen des Dünndarms waren fluoreszierende Immunpraezipitate am häufigsten und stärksten in der Zona submucosa, muscularis und in den Zotten zu erkennen. In der Leber fanden sich vereinzelt Immunaggregate im Bereich der Zentralvenen. In der Milz waren die Praecipitate diffus in unterschiedlicher Verteilung ohne Prädilektionsstellen über das gesamte Organ verstreut. In den Nieren befanden sie sich vor allem in den Tubuli und nur vereinzelt in den Glomeruli. Negativ verliefen die Untersuchungen von Herz, Lunge und Gehirn. Bei den Versuchstieren, deren aus dem Dünndarm gezüchtete E. coli nicht agglutinierten, konnten wie bei den gesunden Versuchs- und Kontrolltieren, keine fluoreszierenden Immunpraezipitate nachgewiesen werden. Ohne Befund waren auch sämtliche Schnitte, die zum Ausschluß unspezifischer Reaktion anstelle des Immunserums mit normalem Kaninchenserum überschichtet worden waren.

Zur Sicherung der Befunde war zu klären, ob die fluoreszierenden Praecipitate auch tatsächlich Immunaggregate darstellten. Für diesen Nachweis ist die Komplementanlagerung an Immunaggregate geeignet. Da die Praecipitatbildung in den histologischen Ileumschnitten am ausgeprägtesten war, wurden sie für diese Untersuchungen verwendet. Die Komplementbindung an den Immunaggregaten wurde mit fluoreszierendem Antikomplement sichtbar gemacht. Als Komplement diente verdünntes Humanserum und als Antikomplement fluoreszenzmarkiertes Antihuman-Globulin vom Kaninchen.

Die Reaktion zwischen Komplement und Immunaggregat wird verhindert:

1. Durch Erhitzen des als Komplement dienenden frischen Serums 30 min. auf 56°C .
2. Entionisierung von zweiwertigen Metallionen (Chelierung mit Citrat oder Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA).

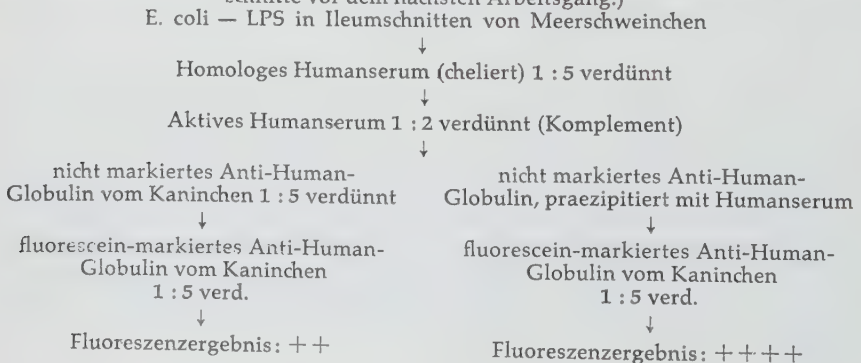
Tabelle 5 zeigt, daß der an den Antigen-Antikörperkomplex angelagerte Faktor des Humanserums die charakteristischen Merkmale des Komplements aufweist. Er ist hitzelabil und seine Bindung wird durch Ca^{++} -Ionenentzug (Chelierung) verhindert. Die bei Verwendung von hitzeinaktiviertem Humanserum auftretende Fluoreszenzreaktion erklärt sich aus dem Persistieren von Komplementresten, die sich bei Inaktivierungsmethoden entziehen. Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, daß andere, nicht komplementäre Komponenten des Humanserums unspezifisch an die Gewebeschnitte gebunden wurden und mit markiertem Antikomplement reagierten.

Weiterhin erhebt sich die Frage, ob es sich bei der Reaktion zwischen dem Komplement und dem fluorescein-markierten Antikomplement um eine echte Antigen-Antikörperreaktion handelt. Trifft das zu, dann muß durch vorherige Rezeptorblockierung mit unmarkiertem Antikomplement der Fluoreszenzeffekt einer nachfolgenden Anwendung markierten Antikomplementes abnehmen. Auf der anderen Seite dürfte ein mit Humanserum praezipitiertes unmarkiertes Antikomplement auf den Fluoreszenzeffekt keinen vermindernenden Einfluß haben.

In der Tabelle 6 sind Versuche dargestellt, die diese zum Teil von Coons⁷ aufgestellten Grundforderungen an den Antigennachweis mit fluorescein-markierten Antikörpern erfüllen.

Tabelle 6
Versuche über die Hemmung und Aufnahme von fluorescein-markiertem Antikomplement:

(Die Pfeile geben den Arbeitsgang an und bedeuten gleichzeitig Waschen der Gewebeschnitte vor dem nächsten Arbeitsgang.)



Aus den Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß das fluoreszenzoptisch dargestellte Material, das aus dem Humanserum in den histologischen Schnitten des Ileums vom Meerschweinchen gebunden wird, dem Komplement entspricht. Dies zwingt zu der Folgerung, daß die histologischen Schnitte komplementbindende Antigen-Antikörper-Komplexe enthalten.

3. Kontrollversuche mit E. coli und Lipopolysacchariden

Mit dem Nachweis fluoreszenzoptisch darstellbarer E. coli-Lipopolysacchariden in histologischen Organ- und Ileumschnitten von Meerschweinchen nach Antibiotikagaben war nicht geklärt, ob das Lipopolysaccharid oder das Antibiotikum den Tod der Tiere auslöst. Zur Beantwortung dieser Frage bekamen Meerschweinchen E. coli ohne Antibiotikum verabreicht.

Methodik:

10 Meerschweinchen von 300 ± 30 g wurden dreimal täglich mit je 1 ml einer 24-stündigen E. coli-Bouillon (Stamm A) gefüttert. Die Keimzahl betrug im Mittel 10^8 /ml. 10 weitere gleichgroße Tiere erhielten dieselbe Bouillonmenge ohne Keime. Von den gestorbenen Versuchs- und den getöteten Kontrolltieren wurden Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Gehirn und ein Teil des Ileums in der beschriebenen Weise histologisch und fluoreszenzserologisch aufgearbeitet. Gleichzeitig ist der Dünndarminhalt kulturell auf Endoagar untersucht worden.

Ergebnis der Colifütterungsversuche

Sämtliche E. coli-gefütterten Meerschweinchen starben innerhalb der ersten 5 Tage. Die histologischen Schnitte zeigten fluoreszierende Immunaggregate wie nach der Antibiotikaverfütterung. Die Organe und Dünndarmabschnitte der Kontrolltiere waren ebenso wie die histologischen Schnitte von den Versuchstieren, die mit normalem Kaninchenserum behandelt waren, fluoreszenzoptisch negativ. Die aus dem Dünndarm der Versuchstiere gezüchteten E. coli agglutinierten mit ihrem Immunerum. Bei den Kontrolltieren konnten keine E. coli im Dünndarm nachgewiesen werden.

Nach der Feststellung, daß auch Verfütterung von E. coli ohne Antibiotikagaben in Organen und Ileum zu fluoreszenzoptisch darstellbaren Lipopolysaccharid-Immunaggregaten führt, wurde geprüft, ob intraperitoneal appliziertes Lipopolysaccharid dieselben Befunde ergibt.

Methodik:

5 Meerschweinchen von 300 ± 20 g erhielten je 2 ml phys. NaCl-Lösung mit LPS A (1, 2, 3, 4 bzw. 5 mg) i. p. injiziert. Die nach dem Tode entnommenen Organe wurden histologisch und fluoreszenzserologisch verarbeitet.

Ergebnis der i. p. Lipopolysaccharid-Injektionsversuche

Bei sämtlichen Tieren trat 4–6 Stunden nach der Lipopolysaccharid-Injektion unter heftigen Convulsionen der Tod ein. Eine zeitliche Abhängigkeit von der applizierten Menge war nicht feststellbar. Der fluoreszenzserologische Organbefund entsprach den Ergebnissen der Antibiotika- und E. coli-Fütterungsversuche.

Besprechung der Ergebnisse

Für den Tod oder das schwere Krankheitsbild von Meerschweinchen nach Antibiotika, insbesondere Penicillin, wird z. T. eine primäre Antibiotikatoxizität verantwortlich gemacht (Rolle, Tonutti, Miescher, Gernez-Rieux, Ambrus, Bohn, Koch, Boyd). Diese Theorie ist aber von anderen Autoren nicht bestätigt worden (Somer, Eyssen, Effenberger^{1, 2}, Ruschmann, Rolle, Eyber, Schmidt, Seeliger, Heiss). Als Ursache ist vielmehr die Vermehrung gramnegativer Bakterien, überwiegend von E. coli, nach Eliminierung der antibiotikaempfindlichen Laktobakterien anzunehmen. Ein exakter Beweis für diese Interpretation ist bis heute nicht gebracht worden. Allerdings existieren verschiedene Beobachtungen die dafür sprechen:

1. Bacitracin ist ein praktisch nicht resorbierbares Antibiotikum, löst aber peroral bei Meerschweinchen die gleichen Erscheinungen wie resorbierbare Antibiotika aus (de Somer, Eyber).

2. Gleichzeitige Gaben von schwerresorbierbaren Sulfonamiden verhindern den Antibiotikatod der Versuchstiere (Gillissen).

3. Verfütterung von E. Coli führt zu den gleichen Krankheitssymptomen wie Antibiotikagaben.

4. Unterschwellige Antibiotikamengen erlauben nach Antibiotikaresistenz der Laktobakterien eine Erhöhung der Dosis ohne toxische Erscheinungen. Ob es sich hierbei gleichzeitig um eine Gewöhnung im pharmakologischen Sinne handelt, konnte nicht beurteilt werden (Eyber).

Die eigenen Untersuchungen betrafen die Frage, ob sich Lipopolysaccharide aus E. Coli in Organen der Meerschweinchen nach Antibiotikagaben darstellen lassen, denn nicht der Keim, sondern sein an der Zelloberfläche verankertes Lipopolysaccharid kann nach Freisetzung und Resorption den Tod der Tiere erklären. Mit Hilfe fluoreszenzserologischer Untersuchungen gelang es bei Terramycin- und Bacitracin-gefütterten Tieren in histologischen Schnitten des Dünndarmes in der Zona submucosa, -muscularis und in den Zotten fluoreszierende Immunaggregate nachzuweisen. In der Leber verteilten sich einzelne Immunaggregate im Bereich der Zentralvenen. In der Milz waren die fluoreszierenden Praecipitate diffus in unterschiedlicher Menge ohne Prädilektionsstellen über das gesamte Organ verstreut. In den Nieren befanden sie sich vor allem in den Tubuli und vereinzelt in den Glomeruli. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Herz,

Lunge und Gehirn waren negativ. Da die Arbeitstechnik keine histologischen Serienschnitte erlaubt, schließen aber die negativen Befunde nicht aus, daß es auch in diesen Organen zu An- und Ablagerungen fluoreszenzserologisch reagierender Antigene (Lipopolysaccharide) kommt. Nicht mit Antibiotika gefütterte Kontrolltiere zeigten keine fluoreszierenden Immunaggregate.

Um zu sichern, daß es sich bei den fluoreszierenden Gebilden im Meerschweinchengewebe um Praezipitate des Lipopolysaccharids mit dem homologen Antikörper handelt, wurden Komplement und fluorescein-markiertes Antikomplement an die gebildeten Immunkomplexe angelagert. Diese Bindung war Temperatur- und Ca^{++} -Ionen abhängig. Im positiven Falle war der Schluß erlaubt, daß die in Meerschweinchenorganen nach Antibiotikagaben nachweisbaren fluoreszierenden Gebilde komplementbindende Antigen-Antikörper-Komplexe und nicht unspezifische Produkte darstellen.

Bei den nach *E. coli*-Fütterung sowie Injektion von Lipopolysacchariden gestorbenen Tieren waren fluoreszenzserologisch die gleichen fluoreszierenden Immunaggregate nachweisbar. Dies bedeutet, daß es nach Antibiotikagaben ebenso wie nach *E. coli*-Fütterung zur Resorption von Lipopolysacchariden aus dem Darm kommt.

Die Darmflora des Meerschweinchens setzt sich nach *de Somer* etwa folgendermaßen zusammen: 70 % Laktobakterien, 23 % Streptokokken, 3 % andere grampositive Bakterien und Bacillen und 2,8 % gramnegative Bakterien. Da die Meerschweinchen gegen *E. coli* praktisch keine natürlich erworbenen Schutz- oder Immunstoffe besitzen, reagieren sie auf *E. coli*-Lipopolysaccharide 17mal empfindlicher als Mäuse, bei denen *E. coli* ständig im Darm vorkommen. Die LD_{50} nach subcutaner Applikation von Lipopolysacchariden bewegt sich bei Meerschweinchen je nach *E. coli*-Stamm zwischen 0,57 bis 1,47 μg (*Roberts*).

Das histologische Bild der mit Antibiotika gefütterten Versuchstiere entsprach dem der Tiere nach Lipopolysaccharid-Gaben. Besonders ausgeprägt waren die Veränderungen im gesamten Verdauungstrakt. In der Darmwand fanden sich Epithelnekrosen, ödematöse Auflockerung der Submucosa, der Muscularis propria und Subserosa. In den Organen waren die histologischen Veränderungen geringer. Diese Befunde stimmen mit den fluoreszenzserologischen Ergebnissen überein, denn auch dort ließen sich in der Darmwand die größten Lipopolysaccharidmengen nachweisen.

Eine perorale Antibiotika-Applikation mit Penicillin oder Bacitracin wirkt sich beim Meerschweinchen ungünstig aus, weil gramnegative Keime, insbesondere *E. coli*, praktisch nicht beeinträchtigt werden und sich nach Entfernung ihrer Antagonisten im Dünndarm ausbreiten. Bei Ratten treten dagegen sichtbare Krankheitssymptome nicht auf (*Seeliger*), da u. E. diese Tierart durch ihr natürliches *E. coli*-Vorkommen im Darm gegenüber vermehrt freigesetzten Lipopolysacchariden widerstandsfähiger ist. Erst die Injektion größerer Lipopolysaccharid-Mengen wirkt bei ihnen toxisch (*Thiersch* ^{1, 2, 3}). Das gleiche trifft für Meerschweinchen zu, wenn eine

Gewöhnung (Immunisierung?) an *E. coli*-Lipopolysaccharide oder an Kulturfiltrate vorausgegangen ist. Eine solche Vorbehandlung verhindert gleichzeitig den letalen Ausgang einer Antibiotikaverfütterung (*Eyber*). Der Tod nach Antibiotikaverfütterung ist also die Folge einer Vergiftung mit dem Endotoxin der *Escherichia coli*.

Die Abwehrmechanismen gegenüber Lipopolysacchariden scheinen sich hauptsächlich auf den Darm zu beschränken, weil nach *Landy*³ parenteral applizierte Lipopolysaccharide bei einer Tierart mit und ohne Darmkeime gleich wirken.

Beim Menschen können nach Antibiotikabehandlung ebenfalls Darmstörungen auftreten. Meist wird dies als allergisches Geschehen (*Scholz*) oder als Schädigung des Kapillarsystems der Darmwand durch das Antibiotikum (*Tonutti*) angesehen. Auch eine vermehrte *E. coli*-Lipopolysaccharid-Freisetzung würde die Erscheinungen erklären. Schwere Komplikationen treten jedoch selten auf, weil der Mensch auf Grund des natürlichen *E. coli*-Vorkommens im Darm (*Henning*) spezifische oder unspezifische Abwehrmechanismen gegen *E. coli*-Lipopolysaccharide besitzt.

Möglicherweise beruhen aber nicht nur Darmerscheinungen, sondern z. B. auch Kreislaufreaktionen, die nach Penicillin beobachtet wurden (*Krause*), auf einer Intoxikation mit Lipopolysacchariden.

Wenn auch die Tierversuche nur bedingt auf die Reaktionen im menschlichen Organismus schließen lassen, so gestatten sie doch Einblicke in die biologischen Vorgänge, die als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen können.

Zusammenfassung

20 Meerschweinchen wurden mit Antibiotika und weitere 10 mit *E. coli*-Suspension gefüttert. 5 Tiere erhielten aus *E. coli* extrahierte Lipopolysaccharide injiziert. Mit fluoreszenzserologischen Untersuchungen an histologischen Schnitten konnten bei allen Tieren in den Organen *E. coli*-Lipopolysaccharide nachgewiesen werden. Vor allem im Darm, Leber, Milz und Niere fanden sich Antigen-Antikörper-Komplexe als Immunpräzipitate. Kontrollversuche sicherten die Spezifität der Reaktionen.

Aus den Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß es unter Antibiotika-Verfütterung beim Meerschweinchen zu massenhafter Vermehrung von *E. coli* mit Aufwandern in untere Dünndarmabschnitte kommt. Dies führt zur Freisetzung und Resorption von *E. coli*-Lipopolysacchariden aus dem Darm, die als Endotoxine den Organismus des Tieres schädigen und meist den Tod auslösen. Ob im Rahmen der Antibiotika-Therapie des Menschen den *E. coli*-Endotoxinen eine solche Rolle zukommt, muß vorerst noch offen bleiben.

Summary

20 guinea pigs were fed with antibiotics and another 10 with a suspension of *E. coli*. 5 animals were injected with lipopolysaccharides extracted from *E. coli*.

Fluorescent tagged antibodies revealed *E. coli* — lipopolysaccharides in the sections of organs of all of the animals.

Antigen-antibody complexes were found as precipitates especially in the intestine, liver, spleen, and kidney. Control experiments affirmed the specificity of the reactions. The results allow the conclusion that the feeding of antibiotics to guinea pigs leads to a massive multiplication of *E. coli* with a migration into the lower regions of the small intestine. This in turn leads to a release and resorption of *E. coli* — lipopolysaccharides from the intestine, which now damage the organism as a whole as endotoxins and mostly cause the death of the animals. If, in the therapy of man with antibiotics, the toxins of *E. coli* play a similar role is presently an open question.

Résumé

On a nourri 20 cobayes avec des antibiotiques et 10 autres avec *E. coli* en suspension. A 5 animaux on a injecté des lipopoly-saccharides extraits de *E. coli*. En examinant des coupes histologiques à l'aide de la sérologie de fluorescence on a pu prouver l'existence de lipopoly-saccharides de *E. coli* dans les organes de tous les animaux. Avant tout dans l'intestin, le foie, la rate et le rein on a trouvé des complexes d'antigènes et anticorps comme précipités immunisants. Des expériences de contrôle ont assuré la spécificité des réactions. On peut déduire des résultats obtenus que l'alimentation de cobayes en antibiotiques a pour conséquence la propagation massive de *E. coli* et la migration dans les parties inférieures de l'intestin grêle. Il en résulte le dégagement et la résorption de lipopoly-saccharide de *E. coli* de l'intestin, qui endommagent comme endotoxines l'organisme de l'animal et qui provoquent le plus souvent la mort. La question de savoir si les endotoxines de *E. coli* jouent le même rôle pour l'homme dans la thérapeutique à antibiotiques doit rester encore sans réponse.

Schrifttum

Algire¹, G. H., F. Y. Legallais u. H. D. Park, J. nat. Cancer Inst. **8** (1947–48) : 53 — Algire², G. H., F. Y. Legallais, ebda. **12** (1951) : 399 — Altschule, Z. B., B. H. Parkhurst u. E. Promisel, Arch. Int. Med. **85** (1950) : 505, zit.: Westphal², O. u. O. Lüderitz — Ambrus, C. M., C. N. Sideri, G. C. Johnsen and J. W. E. Harrison, Antibiot. Chemother. N. Y. **2** (1952) : 521 — Bammer¹, H. u. V. Martini, Pflügers Arch. **257** (1953) : 308 — Bammer², H., Zschr. exper. Med. **130** (1952) : 153 — Bades, I., F. Hollander u. W. Biermann, Gastroenterology **10** (1948) : 697 — Bennett, I. L. and L. E. Cluff, Pharmacol. Rev. **9** (1957) : 427 — Bergmann, H., G. Buschmann, P. Doering, E. Fritze u. F. Wendt, Klin. Wschr. **1954** : 500 — Berthrong, M., L. E. Cluff, J. exper. Med. **98** (1953) : 331 — Böhme, D., Klin. Wschr. **1958** : 837 — Bohn, H. u. E. Koch, Münch. med. Wschr. **1956** : 1589 — Boivin¹, A. u. L. Mesrobianu, C. R. Soc. Biol. **1934** : 115, 306 — Boivin², A. u. L. Mesrobianu, ebda. **1935** : 118, 612 — Boivin³, A. u. L. Mesrobianu, zit.: Schmidt, H.: Grundlagen der spezifischen Therapie: S. 743, Berlin 1940 — Boyd, E. M. u. R. A. Fulford, Antibiot. Chemother. **11** (1961) : 276 — Boyden, S. V., Nature **171** (1952): 402 — Braun, O. H., O. Lüderitz, E. Schäfer u. O. Westphal, Zschr. Hyg. **142** (1956) : 522 — Charitinova, A. M., Zurn. mikr. **29** (1958) : 74 UDSSR: Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. **172** (1959) : 24 — Coons¹, A. H., H. J. Creech and R. N. Jones, Proc. Soc. exper. Biol. Med. **47** (1941) : 200 — Coons², A. H. and E. Berliner, J. Immunol.

45 (1942) : 159 — Coons³, A. H. and M. H. Kaplan, J. exper. Med. **91** (1950) : 1 — Coons⁴, A. H., J. C. Snyder, F. S. Cheever and E. S. Murray, ebda. **91** (1958) : 31 — Coons⁵, A. H., Academic Press, N. Y. 1956 : Vol. 5, p. 1 — Coons⁶, A. H., ebda. 1958 : Vol. 1, p. 399 — Coons⁷, A. H., Schweiz. Z. Path. Bakt. **22** (1959) : 693, 700 — Clayton, R. M., Nature **174** (1954) : 1059 — Creech, H. J., and R. N. Jones, J. amer. chem. Soc. **63** (1941) : 1661 und 1670 — Delafield, M. E., J. Path. Bact. **35** (1932) : 53 — Delaunay¹, A., C. R. Soc. Biol. **137** (1943) : 589 — Delaunay², A., J. Lebrun u. M. Delaunay, C. R. Acad. Sci. **224** (1947) : 1595 — Delaunay³, A., P. Boquet, J. Lebrun, Y. Lehoulst u. M. Delaunay, J. Physiol. (Paris) **40** (1948) : 89 — Delaunay⁴, A., J. Lebrun u. H. Coterau, Ann. Inst. Pasteur **76** (1949) : 565 — Delaunay⁵, A., J. Lebrun, M. Delaunay u. E. Fouquier, ebda. **76** (1949) : 314 — Effenberger¹, E. u. H. P. R. Seeliger, Arzneimittelforsch. **11** (1961) : 38 — dies.², Zschr. Hyg. **146** (1960) : 4. Heft — Eichenberger¹, E., M. Schmidhauser-Kopp, H. Hunri, M. Fricsay u. O. Westphal, Schweiz. med. Wschr. **1955** : 1190 u. 1213 — Eichenberger², E., Acta neuroveg. (Wien) **11** (1955) : 201 — Eichenberger³, E. u. M. Schmidhauser-Kopp, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12** (1954) : C 69 — Eyber, W.-L., Inaugural-Dissertation Mainz 1961 — Eyssen, H., P. de Somer u. P. van Dijk, Antibiot. Chemother. (Basel) **7** (1957) : 55 — Fassbender, H. G., Ärztl. Forsch. **6** (1961) : 15. Jahrg. — Fleischhauer, G., Zbl. Bakt. I. Orig. **173** (1959) : 551 u. ebda. **175** (1959) : 388 — Freeman, G., J. Hematol. N. Y. **7** (1952) : 235 — Fritze, E., u. F. Wendt, Klin. Wschr. **1955** : 523 u. 575 — Gädeke, R., Schweiz. Z. Path. Bakt. **22** (1959) : 751 — Gernez-Rieux, Sevin et Beerens, Presse méd. **577** (1948) — Gillissen, G., u. S. Ho, Arzneimittelforsch. **6** (1956) : 432 — Haas, R., u. R. Thomssen, Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie. Band 34 S. 60 Heidelberg 1961 — Hayes, L., u. N. F. Stanley, Austr. J. exper. Biol. **28** (1950) : 201 — Hegemann¹, F., Zschr. Immun.-Forsch. **111** (1954) : 202 — ders.², ebda. **111** (1954) : 213 — ders.³, ebda. **112** (1955) : 340 — ders.⁴, ebda. **113** (1956) : 201 — ders.⁵, ebda. **113** (1956) : 386 — ders.⁶, Verh. Ges. Inn. Med. **62** (1956) : 327 — Heilbrunn, L. V. u. W. L. Wilson, Science **112** (1950) : 56 — Heiss, F., E. Koch u. G. Wichmann, Zschr. klin. Med. **156** (1960) : 262 — Henning, N., F. Legler, G. Zeitler u. J. Neugebauer, Münch. med. Wschr. **1959** : 673 — Hess, R. and A. G. E. Pearse, Nature **183** (1959) : 260 — Hiramoto, R., K. Engel and D. Pressmann, Proc. Soc. exper. Biol. N.Y. **97** (1958) : 611 — Hohorst, H.-J., Zschr. Hyg. **136** (1953) : 159 — Howard, I. G. u. Mitarb., Nature **179** (1957) : 4554 u. 314 — Hunri, H. (unveröffentlicht), zit.: Westphal, O.² — Kaipainen, W. J. u. O. Widholm, Ann. Med. Exper. Fenn. **36** (1958) : 200 — Kalich, J., Bericht über die Tagung der österreichischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene vom 20.–23. Sept. 1954 in Innsbruck. Zbl. Bakt. I. Ref. **156** (1955) : 173 — Keiderling¹, W. u. O. Westphal, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **57** (1951) : 66 — Keiderling², W., F. Wöhler u. O. Westphal, Arch. exper. Path. Pharmakol. **217** (1953) : 293 — Klein¹, P., Persönliche Mitteilung von Prof. Klein: Mainz, Institut für Med. Mikrobiologie — Klein², P. u. P. Burkholder, Dtsch. med. Wschr. **1959** : 2001 — Koch, E., H. Bohn, F. Heiss u. R. Schneider, Arch. exper. Path. Pharmakol. **220** (1953) : 157 — Krause, P. u. E. Koppermann, Hautarzt **1952** : 168 — Kröger, E., Klin. Wschr. **1957** : 406 — Kunz, E. u. C. P. Miller, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N.Y. **67** (1948) : 221 — Kunz, Ch., Schweiz. Z. Path. Bakt. **22** (1959) : 742 — Landy¹, M., R. C. Skarnes, F. S. Rosen, R. J. Trepani u. M. J. Shear, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. **96** (1957) : 744 — Landy², M., R. J. Trepani u. M. J. Shear, J. exper. med. **110** (1959) : 731 — Landy³, M., J. L. Whitby, J. G. Michael, M. W. Woods and W. L. Newton, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. **109**

(1962) : 352 — Laurence, D. J. R., *Method of Enzym.* Vol. IV, p. 174 (Acad. Press., N.Y. 1957) — Lodenkämper, H., *Zbl. Bakt. I. Orig.* **154** (1939) : 1 — Mayersbach, H., *Acta histochem.* **5** (1958) : 351 — Menten, M. L., H. M. Manning, *J. Med. Res.* **44** (1923/24) : 674 — Middlebrook, G. u. R. J. Dubos, *J. Exper. Med.* **88** (1948) : 521 — Miescher, G. u. C. Böhm, *Schweiz. med. Wschr.* **1947** : 821 — Miles, A. A. u. N. W. Pirie, *Brit. J. exper. Path.* **20** (1939) : 83 — Morgan¹, W. T. J., *Biochem. J.* **31** (1937) : 2003 — Morgan², W. T. J. u. S. M. Pertridge, *Brit. J. exper. Path.* **23** (1942) : 151 — Most, S., *Nature (London)* **168** (1951) : 342 — Müller, F. u. P. Klein, *Dtsch. med. Wschr.* **1959** : 2195 — Necheles, H., 21 st annual Report, *Med. Res. Institute Michael Reese Hosp.* (1949) — Neter¹, E., O. Westphal, O. Lüderitz, E. Eichenberger u. E. A. Gorzysky, zit.: E. Eichenberger¹: *J. exper. Med.* (1955) — Neter², E., C. F. Bertram, C. E. Arbesman, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **79** (1952) : 255 — Neter³, E., A. D. Zak, N. J. Zalewski u. L. F. Bertram, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **80** (1953) : 215 — Neter⁴, E., N. J. Zalewski u. W. W. Ferguson, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **82** (1953) : 215 — Neter⁵, E., L. F. Bertram, A. D. Zak u. M. R. Murdock, *J. exper. Med.* **96** (1952) : 1 — Palmer, J. W. u. T. D. Gerlough, *Science N. Y.* **92** (1940) : 155 — Petuely¹, F. u. G. Lindner, *Arch. Kinderheilk.* **158** (1958) : 248 — Petuely², F. u. G. Lindner, *Schweiz. Zschr. Path. Bakt.* **22** (1959) : 747 — Petuely³, F., ebda. **22** (1959) : 699 — Poetschke, G., H. Uehleke u. L. Killisch, ebda. **22** (1959) : 758 — Raistrick¹, H. u. W. W. C. Topley, *Brit. J. exper. Path.* **15** (1934) : 113 — dies.², *Lancet (London)* **1** (1937) : 252 — Redetzki, H. M., *Proc. Soc. exper. Biol. Med. N.Y.* **98** (1958) : 120 — Roberts, R. S., *J. comp. Path.* **59** (1949) : 284 — Rolle, M. u. H. Mayer, *Zbl. Vet. med. II.* (1955) : 693 — Rosen, F. and M. Landy, *Zschr. Immun.-Forsch.* **118** (1959) : 262 — Rowley, D., *Brit. J. exper. Path.* **37** (1956) : 223 — Ruschmann, E., *Zschr. Hyg.* **140** (1954) : 248, 264 u. 333 — Schmidt, B., J. Buchaly, H. Modde u. H. Wiese, *Zbl. Bakt. I. Orig.* **187** (1962) : 543 — Scholz, O., *Bruns Beitr. klin. Chir.* **191** (1955) : 418 — Seeliger, H. P. R. u. H. Werner, *Path. microbiol.* **25** (1962) : 153 — Silverstein, A. M. and J. F. Kent, *Symposium of Veneral Diseases*, U. S. Dep. of Health, Education and Welfare April 1957 — Skarnes, R. C., F. S. Rosen, M. J. Shear u. M. Landy, *J. exper. Med.* **108** (1958) : 685 — Somer, de P., *Zbl. Bakt. I. Orig.* **170** (1957) : 338 — Takeday, Y. u. I. Tsuchiya, *Jap. J. exper. Med.* **23** (1953) : 9 — Thiersch¹, J. B., *Proc. Soc. exper. Biol. Med. N.Y.* **109** (1962) : 429 — ders.², ebda. S. 437 — ders.³, ebda. S. 440 — Thomas, L., *Ann. Rev. Phys.* **16** (1954) : 467 — Tomscik, *Proc. Soc. exper. Biol. Med. N.Y.* **24** (1926/27) : 810 und 812 — Tonutti, E. u. K. H. Matzner, *Klin. Wschr.* **1950** : 516 — Uehleke, H., *Schweiz. Zschr. Path. Bakt.* **22** (1959) : 724 — Ulbrich, F., *Zbl. Veterinärmed.* **1** (1954) : 603 — Velu, H. u. A. Lutz, *Rev. Immunol.* **21** (1957) : 165 — Vincent, M. H., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **180** (1925) : 239, 407, 1624 u. 1683 — Walker, J., *Biochem. J.* **31** (1937) : 2003 — Weber, G., ebda. **51** (1952) : 155 — Westphal¹, O. u. O. Lüderitz, *Dtsch. med. Wschr.* **1953** : 775 — dies.², *Angew. Chem.* **66** (1954) : 407 — Westphal³, O., O. Lüderitz u. F. Bister, *Zschr. Naturforsch.* **7b** (1952) : 148 — Westphal⁴, O., O. Lüderitz, E. Eichenberger u. W. Keiderling, ebda. **7b** (1952) : 536 u. 594 — Westphal⁵, O., O. Lüderitz, E. Eichenberger u. E. Neter, *Verh. Dtsch. Ges. Verdau.-Stoffwechselkr.* **15** (1955) : 170 — Westphal⁶, O. u. B. Kickhöfen, *Zschr. Rheumaforsch.* **12** (1953) : 321 — Windle, W. F., *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **14** (1952) : 159 — Wolochnow, H., *J. Bact.* **77** (1959) : 164.

